

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI HSP 70 DAN
HSP 90 PADA JARINGAN TESTIS TIKUS (*Rattus
norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Oleh:

**GHIFARI SYAFRIZALDI NASUKHA
145130107111012**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI HSP 70 DAN
HSP 90 PADA JARINGAN TESTIS TIKUS (*Rattus
norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**GHIFARI SYAFRIZALDI NASUKHA
145130107111012**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi
HSP 70 dan HSP 90 Pada Jaringan Testis Tikus (*Rattus novergicus*)
Usia Tua

Oleh :

Ghifari Syafrizaldi Nasukha
145130107111012

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 4 September 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed.
NIP. 197701312005011001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ghifari Syafrizaldi Nasukha

NIM : 145130107111012

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi HSP 70 dan HSP 90 Pada Jaringan Testis Tikus (*Rattus novergicus*) Usia Tua

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, September 2018
Yang menyatakan,

(Ghifari Syafrizaldi Nasukha)
NIM.145130107111012

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap
Ekspresi HSP 70 dan HSP 90 Pada Jaringan Testis Tikus (*Rattus norvegicus*)
Usia Tua**

ABSTRAK

Proses penuaan atau *aging* yang dialami makhluk hidup dapat menyebabkan menurunnya aktifitas fisiologis tubuh dalam tingkat bioseluler. Penuaan dapat mengakibatkan kegagalan protein dalam proses pelipatan sehingga menimbulkan agregat protein yang berakibat pada terganggunya fisiologis reproduksi hewan jantan. HSP 70 dan HSP 90 memiliki peran dalam mempengaruhi produksi estrogen pada hewan jantan yang dapat membantu proses spermatogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak etanol tanaman pegagan *Centella asiatica* mengandung senyawa fitosterol yang berfungsi sebagai profertilitas untuk meningkatkan ekspresi dari HSP 70 dan HSP 90. Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* (SD) berusia 2 tahun dengan berat badan sekitar 300 gram yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu : kelompok kontrol, kelompok yang diberi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 1 mL dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 300 mg/kg BB. Parameter yang diamati adalah ekspresi HSP 70 dan HSP 90 melalui pewarnaan Imunohistokimia (IHK) data ekspresi dianalisis secara statistik dengan *one-way* ANOVA. Hasil Penelitian menunjukkan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) pada tikus jantan usia tua meningkatkan ekspresi HSP 70 dan HSP 90 secara signifikan ($p < 0,05$) dengan dosis terbaik 300 mg/kg BB. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki proses spermatogenesis berdasarkan peningkatan ekspresi HSP 70 dan HSP 90.

Kata kunci : Penuaan, Ekstrak etanol *Centella asiatica*, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 90

The Potential Effect of Gotu Kola (*Centella asiatica*) Ethanol Extract on HSP 70 and HSP 90 Expression on Old Rats (*Rattus norvegicus*) Testicles Tissues.

ABSTRACT

Aging process can cause physiology activity in the body to decrease in biocellular level. Aging can lead to the failure of proteins in folding process that generates protein aggregates and caused the disruption of reproductive physiology system in male animals. HSP 70 and HSP 90 have roles in affecting estrogen production in male animals that can help with the spermatogenesis process. The purpose of this study was to find out the effect of Gotu kola (*Centella asiatica*) ethanol extract contains of phytosterol compound that serves as pro-fertility to increase the expression of HSP 70 and HSP 90. This research used male *Sprague Dawley* (SD) rats (*Rattus norvegicus*) with the age of two years old and weighed around 300 grams that were divided into four groups: control group, group that was given 1 mL of *Centella asiatica* ethanol extract with dose of 100 mg/kg BW, group that was given 1 mL of *Centella asiatica* ethanol extract with dose of 200 mg/kg BW and group that was given 1 mL of *Centella asiatica* ethanol extract with dose of 300 mg/kg BW. The observed parameters consisted of HSP 70 and HSP 90 expression stained by Immunohistochemistry method, the expression data was analyzed statistically using one-way ANOVA method. The result of this study showed that Gotu kola (*Centella asiatica*) ethanol extract in old rats increase the expression of HSP 70 and HSP 90 significantly ($p < 0,05$) with the best dose of 200 mg/kg BW. The conclusion of this study was Gotu kola (*Centella asiatica*) ethanol extract could improve the spermatogenesis process based on the increased expression of HSP 70 and HSP 90.

Keywords: Aging, *Centella asiatica* ethanol extract, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 90

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi HSP 70 dan HSP 90 dengan Pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. selaku dosen pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Bapak Wibi Riawan, S.Si. M.Biomed., selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. drh. Desi Wulansari, M.Vet., drh. Aulia Firmawati, M.Vet. dan drh. Yudit Oktanella, M.Si., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Keluarga penulis, Ayah Suryanta, Ibu Ida Fariatna, yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan baik moril maupun materiil yang tak terhingga untuk menyelesaikan skripsi.
5. Seluruh Dosen dan civitas akademika FKH UB yang selalu memberikan ilmu yang sangat berharga dan bermanfaat bagi penulis selama menjalani studi.
6. Husna Amanina Firdausi yang selalu memberi perhatian, dukungan dan motivasi untuk segera menyelesaikan skripsi tanpa kenal lelah.
7. Tim Old Rattus “Esti, Ganang, Deden, Risa dan Bay” yang bekerjasama dengan baik, serta selalu memberikan dukungan yang tak henti-henti.

8. Teman-teman Public Relation BEM FKH UB, PSDM dan Pengmas PB IMAKAHI, Laboratorium Anatomi Veteriner, Avengers 2014, Kelas 2014 B, Kontrakan Avengers, Tim Jajan, Konco Wacana dan Improve Kelawar atas dukungan dan semangatnya.
9. Teman-teman SD Muhammadiyah Sleman 2007, SMPN 1 Sleman 2010, SMAN 1 Sleman 2013, D3 Kesehatan Hewan SV UGM 2013, dan PMMJT RW 23 atas motivasi, dukungan dan semangatnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, September 2018

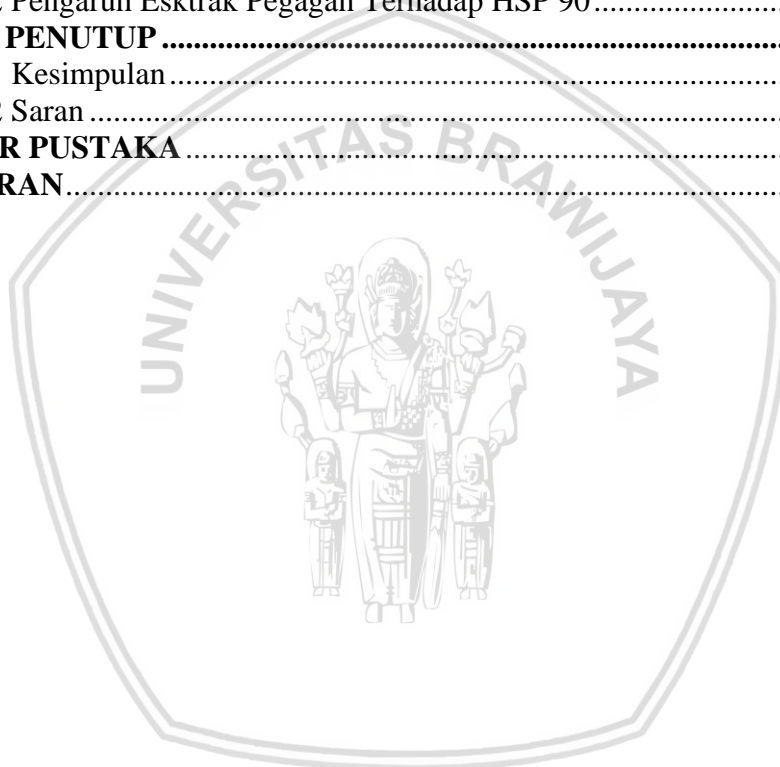
Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penuaan (<i>Aging</i>)	6
2.1.1. Tahap Proses Penuaan	7
2.1.2. Teori Penuaan	8
2.2 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	9
2.2.1. Kandungan Tanaman Pegagan	11
2.2.2. Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan	12
2.2.3. Tanaman Pegagan sebagai Profertilitas	13
2.3. Hewan cobatikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.4. <i>Heat Shock Protein 70</i>	16
2.5. <i>Heat Shock Protein 90</i>	17
2.6. Testis	18
2.7. Spermatogenesis	21
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	25
3.1 Kerangka Konseptual	25
3.2 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 METODE PENELITIAN	28
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
4.2 Sampel Penelitian	28
4.3 Rancangan Penelitian	29
4.4 Variabel Penelitian	29
4.5 Materi Penelitian	30
4.5.1. Alat	30
4.5.2. Bahan	30
4.6. Tahapan Penelitian	30

4.6.1. Preparasi Hewan Coba.....	30
4.6.2. Pembuatan Ekstrak Etanol <i>Centella asicatica</i>	31
4.6.3. Pemberian Ekstrak Etanol <i>Centella asicatica</i> pada Hewan Coba	32
4.6.4. Pengambilan Sampel Organ Testis.....	32
4.6.5. Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Testis	32
4.6.6. Analisis Ekspresi HSP 70 dan HSP 90 pada jaringan testis dengan IHK	33
4.6.7. Analisis Data.....	35
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	36
5.1 Pengaruh Esktrak Pegagan Terhadap HSP 70	36
5.2 Pengaruh Esktrak Pegagan Terhadap HSP 90.....	41
BAB VI PENUTUP	48
6.1 Kesimpulan	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	53



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan.....	12
2.2. Data Biologi Tikus	16
4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian	29
5.1Ekspresi <i>HSP 70</i> Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi	38
5.2 Ekspresi <i>HSP 90</i> Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi	44



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	10
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.3 Anatomi Testis.....	19
2.4 Penampang Histologi sel Leydig dan Sel Sertoli	22
2.5 Proses Spermatogenesis.....	24
3.1 Kerangka konsep penelitian.....	25
5.1 Hasil Immunohistokimia Jaringan Testis (HSP 70)	37
5.2 Hasil Immunohistokimia Jaringan Testis (HSP 90)	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian	55
2. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	56
3. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	57
4. Metode Imunohistokimia.....	60
5. Determinasi Tanaman Pegagan	61
6. Laik Etik Penelitian	62
7. Hasil Uji Statistika HSP 70.....	63
8. Hasil Uji Statistika HSP 90.....	66



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Ab	: Antibodi
ABP	: <i>Androgen Binding Protein</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BB	: Berat Badan
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
FSH	: <i>Folicle Stimulating Hormon</i>
g	: gram
HSP	: <i>Heat Shock Protein</i>
IHK	: Imunohistokimia
kg	: kilogram
KP	: Kontrol Positif
LH	: <i>Luteinizing Hormon</i>
mg	: miligram
mL	: mililiter
NaCl	: <i>Sodium Chloride</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Polysaturated Fatty Acids</i>
Ph	: <i>potential of hydrogen</i>
PO	: Per Oral
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
SD	: <i>Sparague Dawley</i>
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Meningkatnya kesadaran masyarakat luas terhadap pentingnya pemenuhan kecukupan pangan berbanding lurus dengan meningkatnya kebutuhan protein hewani. Hal tersebut akan menumbuhkan permintaan pada sektor peternakan hewan seperti sapi, ayam, babi dan sebagainya, sehingga kebutuhan produk pangan asal hewan di pasaran akan mengalami peningkatan. Pemerintah melalui beberapa programnya juga berusaha meningkatkan produksi produk pangan asal hewan untuk memenuhi kebutuhan masyarakat Indonesia yang semakin tinggi. Peningkatan ini juga menjadi peluang bisnis yang menjanjikan di sektor peternakan. Menurut (Daryanto, 2011), sejak tahun 2000 pemerintah Indonesia telah mencanangkan program swasembada pangan, produk pangan asal hewan juga termasuk didalamnya.

Ketertarikan masyarakat luas terhadap pentingnya kelestarian satwa liar terutama satwa yang dilindungi juga meningkat akhir-akhir ini, seiring dengan mulai menurunnya populasi satwa itu di alam bebas, sehingga banyak Lembaga Konservasi yang memiliki program *breeding* bagi satwa-satwa didalamnya. Fungsi dari program *breeding* tersebut adalah menghasilkan keturunan baru untuk kelestarian satwa itu. Faktor yang paling berpengaruh terhadap produksi bahan pangan asal hewan dan *breeding* adalah reproduksi.

Reproduksi yang baik akan berpengaruh pada hewan ternak atau satwa liar itu untuk menghasilkan keturunan yang baik juga. Reproduksi menjadi perhatian khusus, tidak hanya pada betinanya namun pada pejantan faktor ini juga penting. Permasalahan yang sering ditemui adalah pada usia tua, terjadi penurunan kualitas dari sperma karena *Spermatogenesis* dan *steroidogenesis* menurun pada lanjut usia (Zirkin, 2000)

Proses penuaan (proses *aging*) adalah proses yang normal dialami oleh makhluk hidup di dunia ini, termasuk hewan di dalamnya. Penuaan sering menjadi kekhawatiran banyak orang karena beberapa fungsi organ akan menurun dan terjadi penuaan sel yang akan berpengaruh pada penampilan fisik. Testis adalah organ utama dalam produksi sperma. Penuaan tidak dapat menyebabkan penurunan kualitas dari sperma pada hewan karena produksi hormon testosteron akan menurun yang disebabkan oleh penurunan fungsi organ tadi. Testosteron juga sebagai penghasil estrogen melalui proses aromatase, sehingga jika testosteron yang dihasilkan rendah maka estrogen juga rendah.

Penuaan sering disebut sebagai konsekuensi dari terganggunya sistem di dalam tubuh seperti; sistem imun, stress, perbaikan DNA, eliminasi radikal bebas, dll. yang menyebabkan perubahan dan penurunan fungsi organ dalam tubuh. Kondisi normal dalam tubuh akan menginduksi *Heat Shock Protein (HSP)* yang berfungsi untuk pelipatan (*folding*) molekul dalam tubuh. Kondisi itu akan menyebabkan sebagian besar molekul akan salah terlipat (*misfolded*) dan

dakterlipat(*unfolded*).Kondisiitumenyebabkanmolekul yang *unfolded/misfolded* akanberlanjutke proses agregasidanmenyebabkanterbentuknyaagregat yang akandieliminasi.

Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam meningkatkan jumlah HSP 70 dan HSP 90pada jaringan testis tikus jantan usia tua. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) kemudian mengetahuiekspresiHSP 70 dan HSP 90 pada sel sertoli diukur dengan metode Imunohistokimia (IHK).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat berpengaruhpada ekspresi HSP 70 pada spermatogenesis jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat berpengaruhpada ekspresi HSP 90 pada spermatogenesis jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 2 tahun dan berat badan 300 gram.
2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300mg/kgBB yang diberikan secara peroral selama 21 hari.
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL selama 21 hari yang diberikan secara peroral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuan.
4. Pembacaan ekspresi HSP 70 dan HSP 90 dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan 20 lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung secara manual dengan melihat ekspresi warnanya.
5. Analisa data menggunakan *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA). Jika ada perbedaan maka akan diuji menggunakan uji Tukey menggunakan *software SPSS for windows version 16.0* dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 70 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 90 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas akibat penuaan atau *aging* dan sebagai profertilitas untuk menyuburkan produk spermatozoa.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan dan profertilitas dalam dunia kedokteran hewan

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penuaan (*Aging*)

Proses penuaan atau *aging* adalah suatu proses yang akan dialami oleh semua makhluk hidup termasuk hewan didalamnya. Penuaan adalah hal yang normal ketika bertambahnya usia yang tidak bisa dihindari. Penuaan atau *aging* juga diikuti dengan penurunan fungsi fisiologis dari organ tubuh dan terjadinya perubahan fisik, dari tingkat seluler, organ, hingga sistem karena proses penuaan.

Terdapat dua macam usia, yaitu usia kronologis dan usia biologis. Usia kronologis adalah usia sebenarnya sesuai dengan tahun kelahiran. Sedangkan yang dimaksud dengan usia fisiologis atau usia biologis ialah sesuai dengan fungsi organ tubuh. Maka usia kronologis tidak selalu sama dengan usia fisiologis (Sunarjo, 2012).

Penuaan yang terjadi pada hewan jantan tidak menyebabkan perubahan bentuk dan ukuran pada bagian testis. Namun, penurunan fungsi bagian testis seperti sel leydig yang berfungsi untuk memproduksi dan memberi nutrisi pada sperma akan berkurang, sehingga terjadi penurunan kualitas dari sperma itu sendiri. Selain itu, penuaan pada hewan jantan akan mengurangi kuantitas dari sperma yang dihasilkan dan terjadi penurunan testosteron. Hal ini menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejantan usia tua (Soejono, 2004).

2.1.1 Tahap Proses Penuaan

Perubahan secara fisik dan psikis akan terjadi begitu saja pada proses penuaan, namun melalui beberapa tahapan. Menurut Pangkahila (2007) proses penuaan memiliki tiga tahapan seperti berikut :

1. Tahap Subklinik

Proses penuaan tahap pertama adalah tahap subklinik, pada tahap ini terjadi penurunan aktivitas hormonal dari tubuh. Beberapa hormone yang mengalami penurunan adalah hormone testoteron, *growth hormone*, dan hormone estrogen. Pada tahap subklinik perubahan tidak tampak secara fisik dan tidak tampak dari luar, sehingga pada tahap ini masih dianggap sebagai usia muda dan normal.

2. Tahap Transisi

Proses penuaan tahap kedua adalah tahap transisi, pada tahap ini terjadi penurunan aktivitas hormonal dari tubuh hingga mencapai 25% dengan ditandai penurunan massa otot. Pada tahap transisi perubahan mulai tampak secara fisik dan mulai tampak perubahan dari luar, sehingga pada tahap ini organisme sudah tidak terlihat muda dan mulai tampak menua.

3. Tahap Klinik

Proses penuaan tahap ketiga adalah tahap klinik, pada tahap ini terjadi penurunan aktivitas hormonal dari tubuh semakin berlanjut dan terlihat yang

meliputi hormon testosterone, hormon melatonin, hormon estrogen dan hormon tiroid. Penurunan hormon mengakibatkan hilangnya kemampuan penyerapan nutrisi dari bahan pangan dan lain-lain. Penyakit kronis lebih mudah menyerang karena kemampuan organ sudah menurun.

2.1.2 Teori Penuaan

Proses penuaan memiliki beberapa teori pokok yang memiliki empat dasar teori penuaan atau *aging*, diantaranya:

1. Teori Kontrol Genetik

Teori kontrol genetik ini memiliki peran besar untuk menentukan proses menjadi tua dan berfokus pada genetik yang memprogram sandi sepanjang DNA. Setiap organisme memiliki kode genetik berbeda-beda yang menyebabkan adanya perbedaan fungsi fisik dan mental dengan individu lain sehingga penurunan genetik menentukan umur dan kecepatan proses penuaan pada setiap organisme.

2. Teori "*wear and tear*"

Teori ini mengemukakan bahwa tubuh dan sel mengalami kerusakan karena sering digunakan dan disalahgunakan (*overuse and abuse*). Kerusakan ini tidak terbatas pada organ melainkan juga terjadi pada tingkat sel.

3. Teori *Pace Maker*/Endokrin

Teori ini menjelaskan bahwa proses penuaan atau *aging* diatur oleh *pace maker*, seperti kelenjar timus, hipofisa, hipotalamus dan tiroid sebagai penghasil hormon di dalam tubuh, dan sebagai pengatur keseimbangan hormonal dan regenerasi sel-sel di dalam tubuh hewan. Proses penuaan terjadi akibat perubahan keseimbangan sistem hormonal atau penurunan produksi hormon-hormon tertentu (Cunningham, 2003).

4. Teori Radikal Bebas

Teori radikal bebas dianggap sebagai mekanisme dari proses penuaan. Teori ini menjelaskan bahwa penuaan terjadi karena adanya akumulasi dari radikal bebas itu sendiri di dalam sel yang terjadi sepanjang waktu. Radikal bebas adalah sekelompok elemen di dalam tubuh yang mempunyai elektron tidak berpasangan sehingga tidak stabil. Radikal bebas bebas memiliki reaktivitas yang tinggi karena akan terus menarik elektron dari sel-sel tubuh untuk mendapatkan pasangannya, sehingga dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal karena hilangnya atau bertambahnya elektron pada molekul lain. Radikal bebas akan merusak molekul yang elektronnya ditariknya tadi, sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, hingga kematian sel. Molekul utama dalam tubuh yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein. Proses penuaan penuaan pada kulit karena paparan sinar UV merupakan salah satu implementasi dari teori ini (Cunningham, 2003).

2.2 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman liar yang memiliki prospek yang cukup baik sebagai tanaman obat (Winarto dan Surbakti, 2003). Tanaman pegagan mudah tumbuh dan memiliki daya adaptasi yang cukup luas sehingga tanaman pegagan pegagan dapat ditemukan diberbagai tempat seperti daerah persawahan, perkebunan, di tanah agak lembap, dan dapat ditemukan didaerah dataran rendah hingga dataran tinggi (Besung, 2009). Pegagan banyak ditemukan didaerah Asia dan Afrika khususnya yang beriklim tropis seperti Filipina, Indonesia, Sri Lanka, Madagascar, dan lain-lain.

Pegagan mempunyai rimpang pendek dan stolon yang tumbuh merayap di tanah dan pegagan tidak memiliki batang dengan panjang tumbuhan antara 10-80 cm. Daun pegagan berbentuk menyerupai ginjal kambing dengan tepi bergerigi dan sedikit berambut. Pegagan memiliki bunga berwarna putih atau merah muda yang tersusun dalam karangan berupa payung berjumlah tiga sampai lima. Buah pegagan kecil bergantung, berbentuk lonjong, pipih panjang 2-2,5 mm, berdinding tebal, berwarna kuning dan berbau wangi. (Winarto dan Surbakti, 2003).



Gambar 2.1. Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Sutardi, 2008).

Berdasarkan deskripsi yang telah diuraikan, berikut adalah klasifikasi dari tanaman pegagan (Winarto dan Surbakti, 2003) :

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub-divisi : Angiospermae
Kelas : Dikotyledonae
Ordo : Umbellales
Famili : Umbelliferane
Genus : Centella
Spesies : *Centella asiatica*

1.2.1 Kandungan Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan mengandung berbagai macam senyawa aktif antara lain triterpenoid saponin, triterpenoid genin, minyak essensial, flavonoid, fitosterol dan bahan aktif lainnya (Gupta and Kumar, 2006). Bahan-bahan aktif tersebut

secara umum dapat ditemukan pada organ daun tepatnya pada bagian karingan palisade parenkim. Efek farmakologi utama dari pegagan diketahui berasal dari kandungan senyawa triterpenoid yang dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga memperlancar aliran darah dan memberikan efek menenangkan (Prabowo, 2002). Berikut adalah kandungan nutrisi dari tanaman pegagan pada

Tabel 2.1 :

Tabel 2.1. Kandungan Nutrient Pegagan

Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	% E.P	Komposisi nutrient per 100g sampel					
		Proximate komposisi					
		Kcl	g	g	g	g	g
		Energy	Air	Protein	Lemak	CHO	Serat
		37	87,7	2	0,2	6,7	1,6
		Vitamin					
		µg	µg	µg	µg	µg	µg
		Retinol	Karoten	RE	B1	B2	Niacin
		0	2649	442	0,09	0,19	0,1
		Mineral					
		mg	mg	mg	mg	mg	-
		Ca	P	Fe	Na	K	-
		171	32	5,6	21	391	

1.2.2 Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan

Tanaman pegagan telah banyak dikenal sebagai tanaman dengan sifat antioksidan yang tinggi. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan polifenol yang tinggi. Kandungan polifenol ditemukan dalam tanaman pegagan mulai dari

daun, akar, dan batang. Kandungan polifenol yang tinggi pada tanaman pegagan memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan. Salah satu kandungan zat bioaktif pada tanaman pegagan merupakan antioksidan yang bermanfaat yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan hasil metabolisme dari polifenol. Flavonoid memiliki fungsi sebagai *prior*, *chelators* dan *superoxide anion scavenger* serta memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dalam melawan *peroxy radicals* dibandingkan dengan vitamin E dan vitamin C (Kormin, 2005). Aktivitas antioksidan dari tanaman pegagan menunjukkan dapat mengurangi reduksi hidroperoksida, inaktivasi radikal bebas, *chelation* dari ion logam atau kombinasi ketiganya.

Pegagan juga dapat mencegah kerusakan oksidatif yang ada pada beberapa kelainan neurologis termasuk stroke, parkinson, dan alzheimer serta dapat memperbaiki keadaan neurological antioksidan yang berhubungan dengan penuaan (Sunarjo, 2012).

1.2.3 Tanaman Pegagan sebagai Profertilitas

Pegagan merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan berupa fitosterol yang dapat berfungsi untuk menyuburkan reproduksi. Fitosterol merupakan senyawa turunan sterol yang dahulu hanya ditemukan pada hewan dalam bentuk kolesterol sebagai bahan baku pembentuk hormone seks (Lusiana dkk., 2013). Fitosterol merupakan triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin *siklopentana perhidrofenantrena*, kerangka dasar tersebut menyerupai kerangka steroid yaitu kolesterol. Senyawa triterpenoid dapat meningkatkan senyawa steroid

dalam darah. Peningkatan kadar steroid dalam darah disebabkan oleh senyawa triterpenoid yang memiliki keserupaan dan kemungkinan adanya kaitan biogenesis dengan steroid dan steroid merupakan bahan baku untuk mensintesis hormon testosteron. Kolesterol dipakai untuk biosintesis hormon steroid yang mencakup hormon reproduksi, diantaranya androgen (testosteron) (Elyall, 2012).

Senyawa-senyawa fitosterol yang terdapat pada tumbuhan antara lain yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Senyawa fitosterol dapat mempengaruhi sel leydig memproduksi testosteron. Hormon testosteron memiliki fungsi untuk pematangan akhir spermatozoa. Selain dapat mempengaruhi spermatogenesis, testosteron juga mengatur sifat-sifat seks sekunder, rangsangan seksual, perkembangan saluran-saluran kelamin dan kelenjar aksesoris.

2.3 Hewan Coba Tikus

Hewan coba atau hewan laboratorium adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian adalah tikus putih dengan nama ilmiah *Rattus norvegicus*. Tikus putih banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada hewan lain. Pada **Gambar 2.2**, menjelaskan ciri-ciri pada tikus putih, yaitu rambut berwarna putih,

mata merah, panjang tubuh sepanjang 440 mm, panjang ekor mencapai 205 mm serta pada usia dewasa berat badannya berkisar sekitar 100-105 gram (Akbar, 2010).



Gambar 2.2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* termasuk ke dalam mamalia yang memiliki ekor panjang dan digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Mata tikus berwarna merah. Berat badan dewasa yaitu 250 g sampai 300 g untuk betina, sedangkan pada tikus jantan memiliki ukuran sekitar 450 g sampai 520 g. Tikus ini biasanya memiliki ekor yang lebih panjang dari tubuh berfungsi untuk meningkatkan rasio panjang tubuh (Solihati, 2013).

Berikut klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers and Adiyati (2011) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus novergicus*

Sebelum melakukan suatu penelitian kondisi fisiologis normal hewan coba harus diperhatikan agar tidak mengalami kesalahan saat melakukan perlakuan pada tikus dan ketika melakukan pemeliharaan yang disebabkan oleh ketidaktahuan kondisi fisiologis normal hewan coba itu sendiri. Tikus putih atau (*Rattus novergicus*) galur SD memiliki keadaan biologis yang sebagian besar sama pada tikus putih pada umumnya. Data biologi tikus putih (*Rattus novergicus*) disajikan pada **Tabel 2.2** sebagai berikut :

Tabel 2.2. Data biologi tikus

No	Kondisi Biologi	Jumlah
1	Berat Badan	
	Jantan	300-400 gr
	Betina	250-300 gr
2	Lama hidup	2,5-3 tahun
3	Temperatur tubuh	37,5°C
4	Kebutuhan air	8-11 ml/100 gr BB
	Kebutuhan makanan	5 gr/100 gr BB
5	Umur dewasa	50-60 hari
6	Volume darah	57-70 hari
7	Tekanan darah	
	Sistolik	84-174 mmHg
	Diastolik	58-145 mmHg
8	Frekuensi jantung	330-480 / menit
9	Frekuensi respirasi	66-114 / menit
10	Tidal volume	0,6 – 1,25 mm

(Kusumawati, 2004).

2.4 Heat Shock Protein 70 (HSP 70)

Heat Shock Protein atau HSP, dikenal juga sebagai stress protein. HSP merupakan protein dalam sel makhluk hidup termasuk hewan yang dapat ditemukan dalam semua fase perkembangan makhluk hidup tersebut. HSP dihasilkan karena adanya *Heat Shock Respon* (HSR). HSR adalah suatu respon yang berbasis genetik untuk menginduksi gen-gen yang mengkode *molecular chaperon*, protease dan protein-protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap jejak seluler yang berhubungan dengan terjadinya kesalahan *protein folding* (Trot dkk, 2008). HSP yang diekspresikan dalam keadaan normal dapat juga meningkat jika ada stressor. Salah satu tanda adanya HSR ini adalah meningkatnya sintesis HSP yang merupakan salah satu protein yang berbentuk molekul *chaperon* (Widjaja *et al*, 2009).

HSP adalah protein terinduksi secara kuat setelah stress seperti penuaan, stress oksidatif atau iradiasi (Udiyanto, 2013). Adanya faktor pemicu stress sel ini akan menimbulkan respon sel tubuh yang bermacam-macam, seperti produksi dari HSP ini. HSP berperan sebagai *chaperone* yang berfungsi melindungi protein lain dari agregasi, melonggarkan protein yang beragregasi, membantu pelipatan protein baru (*folding protein*) atau pelipatan kembali protein yang rusak (*re-folding protein*), mengasingkan protein yang rusak menjadi agregat lebih besar (Widjaja *et al*, 2009).

HSP 70 secara normal berada di dalam sel dan banyak ditemukan pada sitoplasma sel eukariotik, nucleus, mitokondria dan Reticulum Endoplasma (RE). HSP 70 dibutuhkan untuk sintesa protein, translokasi dan *protein folding* (Tkavoca, 2012). Fungsi dari HSP 70 adalah mengikat dan menstabilkan polipeptida yang baru muncul dari ribosom dan mentranslokasikan protein protein melewati membrane ke mitokondria dan Reticulum Endoplasma (RE). setiap interaksi dari HSP 70, selalu dimediasi oleh ATP dan selalu memerlukan satu atau lebih molekul co-chaperon. Kenaikan pada HSP 70 berkaitan langsung dengan proses apoptosis. Induksi terhadap HSP 70 sebagian besar terjadi karena jumlah rantai polipeptida yang belum terikat berlebihan.

2.5 Heat Shock Protein 90 (HSP 90)

HSP 90 adalah protein dalam bentuk dimer yang besar dan dapat ditemukan hampir disemua kompartmen sel eukariotik. Kebanyakan genom eukariotik menkode spesifik kompartmen protein HSP 90. HSP 90 juga merupakan protein yang penting untuk pembentukan dari reseptor steroid kompleks. HSP 90 terdapat hingga mencapai 2% dari total protein seluler dan merupakan molekul dengan jumlah yang banyak (Purandhar *et al*, 2014). Menurut Li *et al* (1997) dalam Purandhar (2014), HSP 27, HSP 70 dan HSP 90 dianggap sebagai anti-apoptosis, karena ketiganya mampu mengikat molekul pro-apoptosis seperti sitokrom c dan *Apoptotic protease activating factor 1* (*Apaf1*).

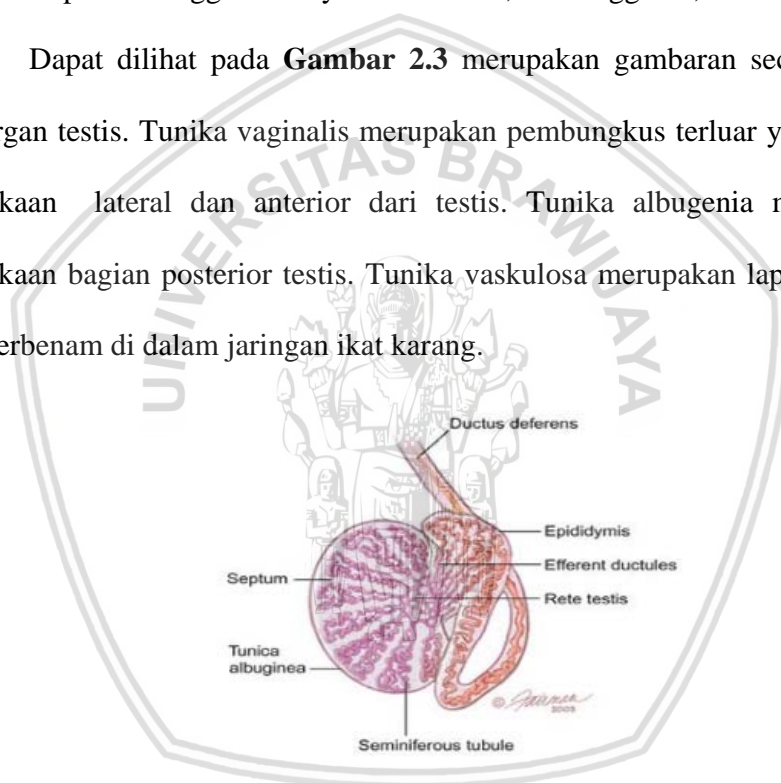
Beberapa faktor penting yang terlibat dalam induksi HSP 90 adalah hipertermia, stress oksidatif, peradangan, kerusakan sel (Purandhar *et al*, 2014). HSP 90 secara normal ditemukan dalam sitosol eukariotik dan retikulum endoplasma mamalia. HSP 90 bereperan penting dalam pembentukan steroid reseptor kompleks dan berepran dalam aktivasi / inaktivasi reseptor hormone steroid yang apabila reseptor hormone tersebut berikatan dengan hormone steroid yang sesuai maka ikatan dengan HSP 90 akan terlepas. HSP 90 juga berfungsi membantu memecah ATP menjadi ADP dan Pi sehingga menimbulkan tenaga, sehingga melalui pemanfaatan sejumlah co-chaperons (HSP 70) dan ATP, fungsi pendamping HSP 90 sangat penting terutama menjaga sel agar bebas dari tekanan sehingga dapat menatur regulasi protein yang sangat penting dalam pertumbuhan dan perkembangan.

2.6 Testis

Testis merupakan kelenjar ganda karena secara fungsional testis bersifat endokrin dan eksokrin. Testis merupakan organ kelamin jantan yang berfungsi sebagai sintesis hormon androgen (terutama testoteron) sebagai fungsi endokrin atau hormonal. Testis menghasilkan sel kelamin atau spermatozoa dan tempat berlangsungnya spermatogenesis sebagai fungsi eksokrin. Kedua fungsi testis ini menempati posisi terpisah di dalam testis. Biosintesis dari hormone androgen berlangsung dalam sel leydig di dalam jaringan interlobular, sedangkan proses spermatogenesis berlangsung dalam epitel tubulus seminiferous (Janqueira, 2007).

Testis merupakan sepasang organ yang berbentuk oval yang berukuran sama besar. Testis bersama epididymis berada didalam skrotum yang merupakan sebuah kantung ekstra abdomen tepat dibawah penis (Sherwood, 2009). Fungsi utama skrotum adalah untuk memberikan lingkungan yang lebih dingin dibanding dengan tempeatur rongga tubuh yaitu sekiar $13,3^{\circ}\text{C}$ hingga $17,2^{\circ}\text{C}$.

Dapat dilihat pada **Gambar 2.3** merupakan gambaran secara anatomis dari organ testis. Tunika vaginalis merupakan pembungkus terluar yang menutupi permukaan lateral dan anterior dari testis. Tunika albuginea menebal pada permukaan bagian posterior testis. Tunika vaskulosa merupakan lapisan terdalam yang terbenam di dalam jaringan ikat karang.



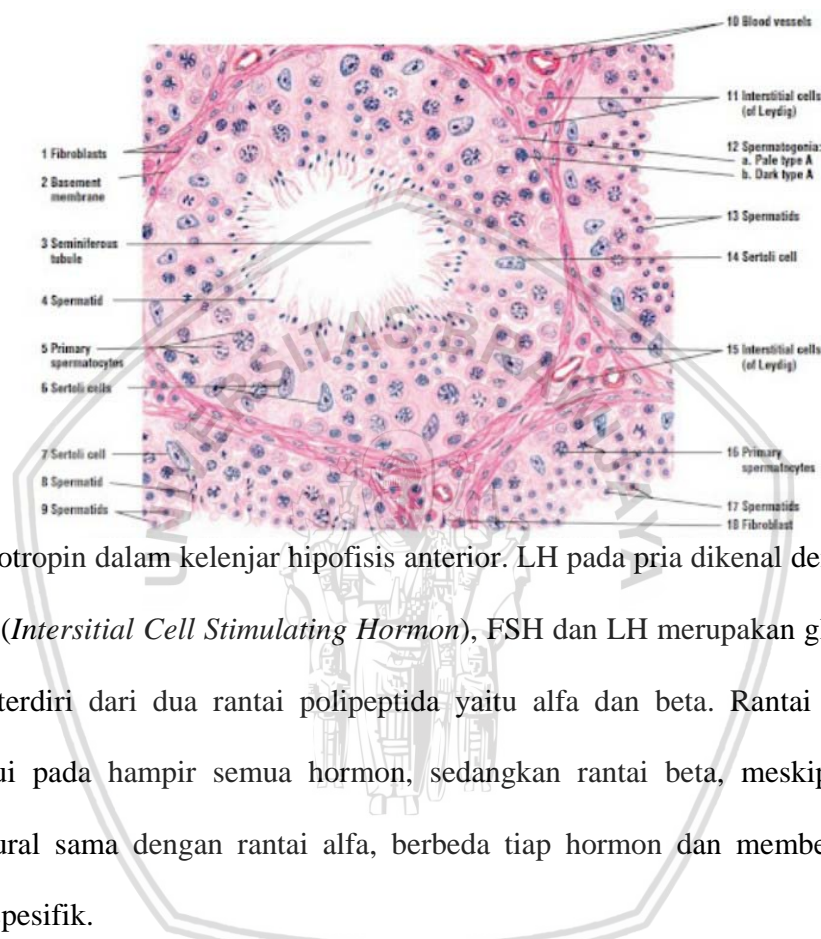
Gambar 2.3. Anatomi testis (Faranita, 2009).

Testis banyak mengandung tubulus seminiferus. Tubulus seminiferous tersebut terdiri atas deretan sel epitel yang akan mengadakan pembelahan mitosis dan meiosis sehingga menjadi sperma. Epitel tubulus semineferus terdiri dari dua macam sel yang berbeda yaitu sel sertoli dan sel sel germinatif. Sel sertoli adalah

sel yang berbentuk panjang dan kadang membentuk seperti pyramid. Sel ini terletak dekat atau dinatra sel-sel germinatif. Sel ini bersifat fagosit karena sel sertoli memakan sel-sel mani yang telah mati atau telah mengalami degenarasi, selain dia sendiri memberi makan pada sel-sel mani yang masih muda. Sel germinatif yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis, sebelum pembuahan (fertilisasi). Tingkat perkembangannya adalah mulai dari spermatogonia (sel paling muda) akan mengalami mitosis beberapa kali menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer akan membagi diri menjadi spermasit sekunder yang akan membagi dirinya lagi menjadi spermatid dan pada saat ini jumlah kromosome menjadi separohnya (haploid). Tiap-tiap sel spermatid akan mendewasakan diri menjadi sel-sel spermatozoa atau sel mani.

Sel stroma atau tenunan pengikat di luar tubulus seminiferus. Pada jaringan ini terdapat pembuluh darah, limfe, sel syaraf dan sel makrofag. Sel-sel yang terdapat diantara tubulus seminiferus disebut sel interstitial atau sel leydig. Sel ini menghasilkan hormon seks jantan yang disebut testoteron (Janqueira, 2007). Namun, hormon testoteron ini juga dapat dihasilkan oleh ovarium (betina) dan kelenjar adrenal. Testis mengeluarkan beberapa hormon yang disebut androgen meliputi hormon testoteron, dihidrotestoteron, dan androsteredion. Testoteron jumlahnya lebih banyak dari yang lainnya sehingga dapat dianggap sebagai hormon testikular terpenting. Pada umumnya testoteron bertanggung jawab terhadap berbagai sifat maskulinisasi tubuh. Selain itu testoteron juga

berperan mengatur hipofisis anterior melalui mekanisme umpan balik. Kedua hormon gonadotropik, LH, dan FSH, disekresikan oleh sel-sel yang sama disebut



gonadotropin dalam kelenjar hipofisis anterior. LH pada pria dikenal dengan nama ICSH (*Interstitial Cell Stimulating Hormon*), FSH dan LH merupakan glikoprotein yang terdiri dari dua rantai polipeptida yaitu alfa dan beta. Rantai alfa dapat ditemui pada hampir semua hormon, sedangkan rantai beta, meskipun secara struktural sama dengan rantai alfa, berbeda tiap hormon dan memberikan aksi yang spesifik.

Gambar 2.4 Penampang histologi sel Leydig dan sel Sertoli

2.7 Spermatogenesis

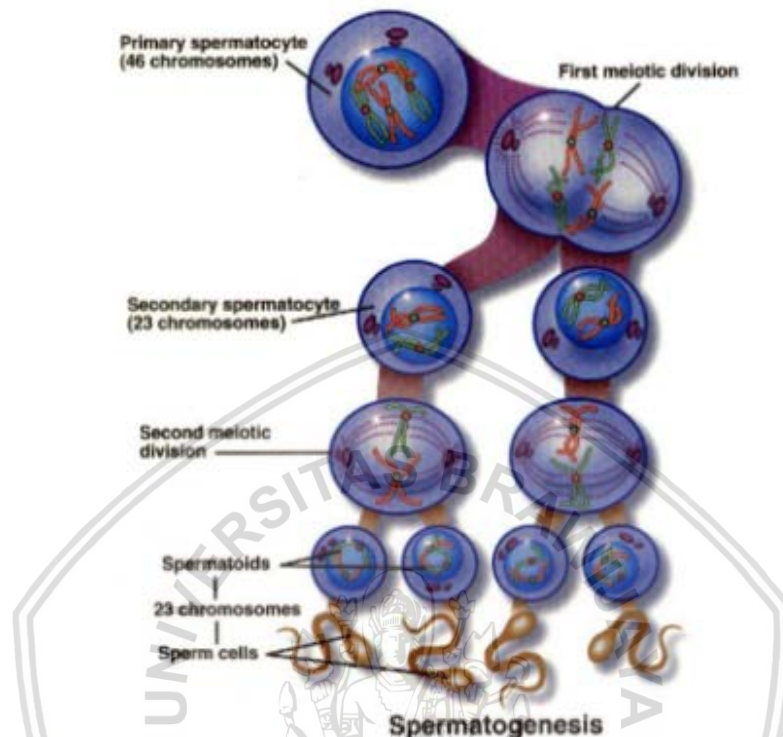
Spermatogenesis adalah proses pembentukan dan pemasakan sel gamet jantan yang terjadi di testis tepatnya di tubulus semineferus yang kemudian membentuk Spermatozoa atau sering disebut *sperm cell*. Spermatogenesis diatur

oleh hormon gonadotropin dan testosterone. Peralihan dari bakal sel kelamin yang aktif membelah ke sperma yang masak serta menyangkut berbagai macam perubahan struktur yang berlangsung secara berurutan.

Spermatozoa merupakan hasil perkembangan dari sel germinal yang berada di testis, dikeluarkan dari tubuh organisme jantan dalam bentuk semen (spermatozoa dan plasma semen). Spermatozoa terbentuk di dalam tubulus seminiferus dari sel induk spermatozoa yang diploid, spermatogonia yang terletak pada membrane basalis. Spermatogenesis adalah proses pembelahan dan perkembangan spermatogonia (*germ cell*) membentuk spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testis. Selama proses tersebut jumlah kromosom direduksi dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n) pada setiap sel, juga terjadi reorganisasi komponen-komponen inti sel dan sitoplasma secara meluas. Spermatogenesis meliputi spermatositogenesis atau pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonia menjadi spermatid dan spermiogenesis atau pembentukan spermatozoa dari spermatid. Spermatositogenesis dikendalikan oleh FSH dari adenohypophysis dan spermiogenesis berada di bawah pengaruh LH dan testosterone.

Spermatogonia merupakan sel bakal spermatozoa, terletak pada membran basal epitel tubulus seminiferus, dengan ciri-ciri vesikular dengan membran inti yang jelas. Spermatogonia memperbanyak diri (proliferasi) secara kontinyu melalui proses mitosis, menghasilkan spermatogonia dalam jumlah besar.

Beberapa spermatogonia berhenti berproliferasi, kemudian mengalami differensiasi dan membelah secara mitosis menjadi spermatosit primer. Setiap spermatosit primer bergerak ke arah dalam dari epitel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Sel ini mengandung kromosom diploid berkembang menjadi sel yang berukuran paling besar dari seluruh sel spermatogenik. Selanjutnya, terjadi duplikasi DNA dan mengalami pembelahan meiosis I sehingga menghasilkan spermatosit sekunder. Pada pembelahan ini menghasilkan variasi genetik, seperti pemisahan secara random kromosom induk dan *crossover* kromosom, meningkatnya variasi genetik gamet. Kemudian spermatosit sekunder membelah lagi melalui proses meiosis II untuk menghasilkan empat sel spermatid yang mengandung kromosom haploid (Hayati, 2010).



Gambar 2.5. Proses Spermatogenesis (Constantinescu, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi spermatogenesis dapat dikelompokkan menjadi dua bagian yakni:

1. Faktor endogen berasal dari dalam tubuh hewan itu. Faktor endogen yang mempengaruhi spermatogenesis adalah dari endokrin dan genetik. Selain hormon stroid, terdapat juga senyawa lain yang disekresikan oleh testis yaitu inhibin. Inhibin ini dihasilkan oleh sel Sertoli dan mempunyai fungsi menekan hipofisis untuk mensekresi gonadotropin (Janqueira, 2007).
2. Faktor eksogen berasal dari luar tubuh hewan itu. Faktor eksogen yang mempengaruhi spermatogenesis meliputi bahan kimia dan obat-obatan yang

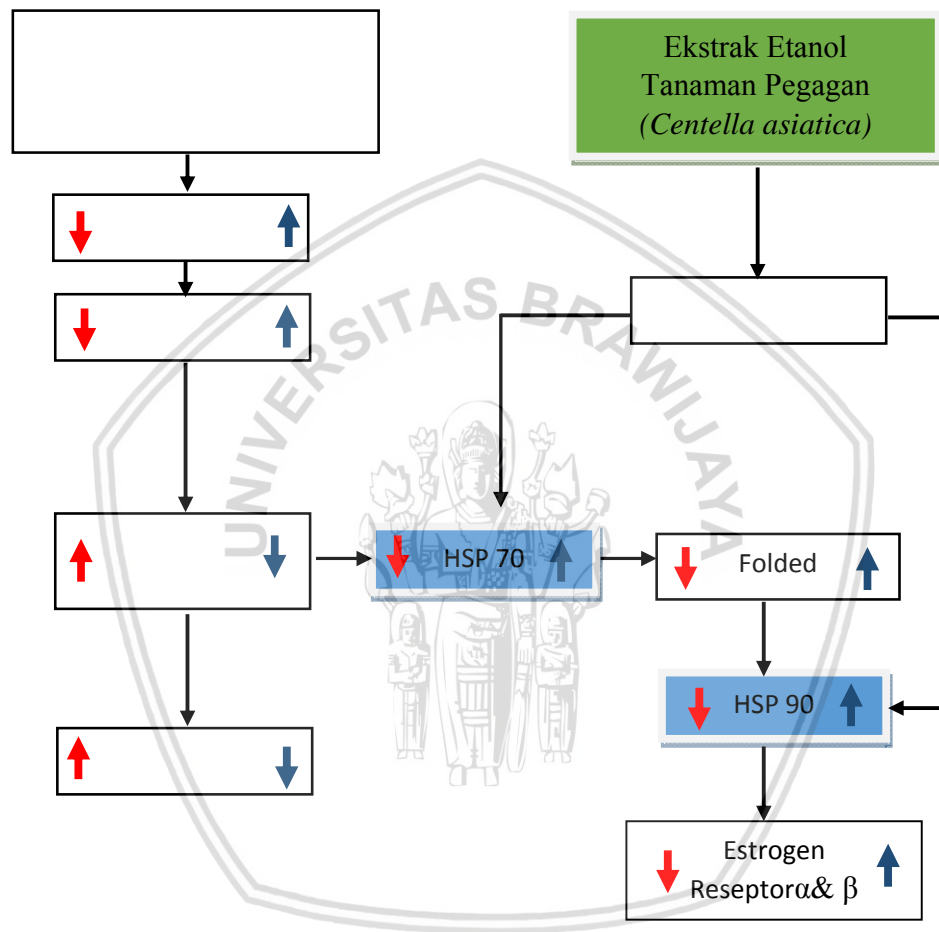
dikonsumsi (misalnya simetidin, spironolakton dan nitrofurantoin)
(Widayati, 2008).

3. Varikokel merupakan kelainan anatomis yang paling sering ditemukan pada kemandulan jantan. Varikokel adalah varises (pelebaran vena) di dalam skrotum. Varikokel bisa menghalangi pengaliran darah dari testis dan mengurangi pembentukan sperma (Widayati, 2008).



BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:



: VariabelTergantung



: KondisiTikusTua

: Variabel Bebas



: Efek Pemberian Pegagan

: Mekanisme

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan pada penelitian ini merupakan galur Sprague Dawley dengan usia 2 tahun. Proses penuaan secara fisiologis mengakibatkan tikus mengalami penurunan dari testosteron. Hormon testosteron menghasilkan hormon estrogen melalui proses aromatase. Hormon estrogen akan menyebabkan seluruh membran sel dan mengikat Estrogen Reseptor-HSP kompleks. Estrogen yang rendah disebabkan oleh rendahnya testosteron dan kondisi penuaan akan menyebabkan *low integrity of protein*. Kondisi tersebut mengakibatkan meningkatnya molekul yang gagal melipat sehingga pada kondisi tersebut meningkatkan pembentukan agregat. Kegagalan dalam melipat (*misfolded*) dan akan menyebabkan agregasi yang menimbulkan adanya agregat.

Kondisi *unfolded/misfolded* akan dibantu oleh *Heat Shock Protein (HSP)* sebagai chaperone agar bisa *recovery/refolding* dan tidak mengalami agregasi. Kondisi penuaan ini memperlihatkan bahwa protein *Heat Shock Protein 70 (HSP 70)* dan *Heat Shock Protein 90 (HSP 90)* dalam kondisi yang rendah atau mengalami penurunan, sehingga molekul banyak yang mengalami kegagalan dalam melipat sehingga membentuk agregasi karena rendahnya *Heat Shock Protein 70 (HSP 70)* dan *Heat Shock Protein 90 (HSP 90)*. *HSP 70* berfungsi sebagai chaperon untuk membantu dalam proses *refolding*, ketika protein sudah terlipat dengan baik (*folded*) maka protein akan dirilis menuju *HSP 90*. Fungsi dari

HSP 90 sendiri adalah menerima protein yang sudah terlipat (*folded*) maka HSP 90 ini akan merilis menuju protein yang lebih besar, salah satunya adalah reseptor estrogen.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) diberikan pada tikus usia tua melalui sonde peroral. Tanaman pegagan memiliki kandungan fitosterol. Sterol yang terdapat pada tumbuhan dikenal sebagai fitosterol, sedangkan pada hewan disebut estrogen (Lusiana dkk., 2013). Senyawa fitosterol berguna untuk profertilitas sehingga dapat meningkatkan jumlah sel-sel spermatogonia selama proses spermatogenesis. Senyawa fitosterol juga memiliki fungsi sama dengan estrogen pada hewan. Estrogen sendiri akan bekerja dengan menginduksi HSF-1 kemudian HSF-1 akan menstimulasi ekspresi dari HSP 70. Estrogen nantinya akan melakukan interaksi dengan reseptor estrogen yang sudah mengalami lipatan protein, dan menjadi estrogen yang aktif siap digunakan untuk proses spermatogenesis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan ekspresi HSP 70 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua.
2. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan ekspresi HSP 90 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2017 hingga bulan Oktober 2017. Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

- a. Proses ekstraksi *Centella asiatica* dilakukan di Materia Medica, Batu.
- b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorim Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. Pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- d. Pembuatan preparat histologi testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- e. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) galur SD yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi hewan coba menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) pada **Tabel 4.1** :

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol	Tikus usia muda hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i>
Perlakuan 1	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 100mg/kg BB
Perlakuan 2	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 200mg/kg BB
Perlakuan 3	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 300mg/kg BB dan dilakukan pembedahan pada hari ke 22

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Ekstrak *Centella asiatica*

Variabel tergantung : Ekspresi HSP 70 dan ekspresi HSP 90

Variabel kendali : Homogenitas tikus SD (jantan, berat badan dan umur), homogenitas pakan (komposisi ransum pakan disusun berdasarkan standar AOAC yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air), homogenitas kandang (ukuran, suhu, dan kandang).

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, box paparan, sonde, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, cover glass, pot sampel, refrigerator, tabung reaksi, sentrifugator, pipet tetes, gelas ukur, maserator, rotary evaporator, vacuum drying, dan TEM, dan Mikroskop cahaya.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman (*Centella asiatica*), alkohol, NaCl fisiologis, aquades, serbuk simplisia, etanol 70%, letichin, ekstrak pegagan, aqua bebas CO₂, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, PBS, dan Anti HSP 70 dan Anti HSP 90.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) strain SD (*Sparague Dawley*) umur 2 tahun berjenis kelamin jantan hasil pengembangbiakan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UB dengan bobot badan awal berkisar 300 gram. Kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Suhu ruangan diatur pada 22-24°C dengan kelembapan udara 60%-70%. Pakan yang diberikan sebanyak 20 g per ekor per hari. Air minum diberikan *ad libitum*. Penimbangan bobot badan per tikus dilakukan setiap 3 harisekali dandilakukan pembersihan kandang. Aklimatisasi tikus dilakukan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi (Pratama, 2013).

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cetella asiatica*)

Phytosome ekstrak tanaman pegagan pada penelitian ini dibuat dengan cara membentuk ekstrak terlebih dahulu. Sebanyak 500 g serbuk simplisia ditambahkan 2 L etanol 70%, dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C dan di *vacum drying* untuk menghilangkan kadar air.

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk *phytosome* dengan metode sonikasi (mencampur letichin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu distirer ± 3 jam dengan *magnetic stirrer* 2000rpm. Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO₂. Lalu dilakukan karakterisasi menggunakan TEM.

4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Cetella asiatica*) pada Hewan Coba

Ekstrak etanol tanaman pegagan yang diberikan pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan usia tua dengan dosis bertingkat sesuai Gohill (2010), 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB sesuai masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak pegagan sebanyak 1 mL per tikus per hari dan dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 21 hari.

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada akhir penelitian dilakukan *euthanasi* dengan cara dislokasio os cervical kemudian tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuka muskulus sepanjang abdomen sampai bawah dagu kemudian testis diambil dari scrotum di daerah

perpubis dilanjutkan dengan memotong testis kemudian diisolasi. Organ testis lalu dibilas dengan NaCl fisiologis pada cawan petri.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Testis

Setelah hewan dilakukan pembedahan kemudian organ testis diambil lalu dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, dimasukkan ke dalam larutan formaldehide 4% selama 24 jam. Setelah testis terfiksasi, larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai “*stopping point*” dengan pengertian jaringan dapat disimpan lama pada larutan ini. Proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan xylol (*clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin (*embedding*). Jaringan dalam blok parafin disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 5 μ m dilekatkan pada gelas obyek, kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam.

4.6.6 Analisis Ekspresi HSP 70 dan HSP 90 pada jaringan testis dengan Metode IHK

Menurut Samson and Unitily (2014), pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang harus dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pembuatan *neufren* (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia

meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan *neufren* (agen penempel), penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan memilih preparat irisan yang paling bagus, kemudian dilakukan perlakuan sesuai prosedur berikut ini :

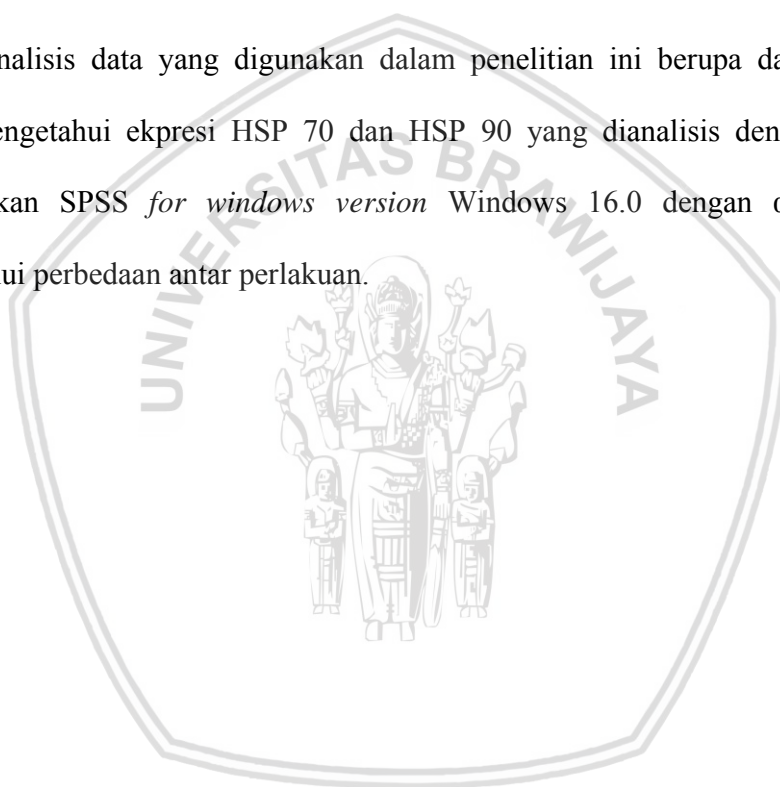
1. Deparafinasi (xylol I dan II). Berfungsi untuk menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Caranya adalah preparat dimasukkan ke dalam xylol bertingkat I sampai II masing-masing selama lima menit.
2. Rehidrasi (alkohol absolut III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit.
3. Penghilangan peroksidase endogen (jika terlambat hasilnya positif semua). Hal ini dilakukan untuk membloking enzim-enzim endogen.
4. Dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 μ L selama 5-10 menit (2x) dilanjutkan pencucian dengan menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit (2x).
5. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS (agar memblok antigen/Ag non

- spesifik dan tidak mengacaukan reaksi), kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit.
6. Dicuci dengan PBS (100 μ L) selama 5 menit (3x).
 7. Disiapkan antibodi/Ab primer HSP 70 dan HSP 90 (*Santa cruz*), kemudiandiberi antibodi/Ab primertersebut dan diinkubasi dalam refigator suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi.
 8. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 μ L) selama 10 menit (3x).
 9. Diberi antibodi/Ab sekunder ScyTek CRF *Anti-polyvalent HRP Polymer-ABZ100* (pengenceran 1:50 ml) sebanyak 50-60 atau 80 μ l per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit.
 10. Dicuci dengan PBS (100 μ L) selama 5 menit (3x).
 11. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-*diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H₂O₂ (50 μ L). Proses pencampuran ii dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat.
 12. Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit.
 13. Dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol

absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Selanjutnya sediaan histologis siap diamati di bawah mikroskop, direkam dengan menggunakan foto digital sebanyak 20 lapang pandang menggunakan perbesaran 1000x.

4.6.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi HSP 70 dan HSP 90 yang dianalisis dengan ANOVA menggunakan SPSS *for windows version* Windows 16.0 dengan $\alpha=0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.



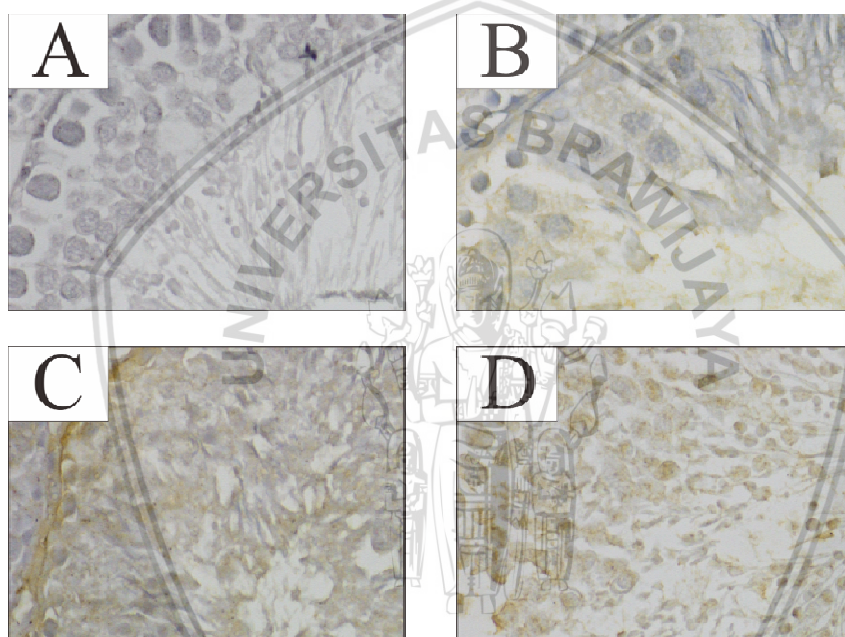
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi HSP 70 Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan terhadap ekspresi HSP 70 (*Heat Shock Protein 70*) jaringan testis tikus putih usia tua dapat diamati menggunakan metode immunohistokimia pada jaringan testis. Hasil gambaran immunohistokimia dari ekspresi HSP 70 ditandai dengan terlihatnya warna coklat pada jaringan testis tersebut yang disebabkan oleh adanya ikatan antigen dan antibodi pada jaringan yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder sehingga dengan adanya penambahan substrat kromagen akan menimbulkan warna kecoklatan pada jaringan yang terekspresi. Pengamatan pada preparat ini dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 dengan 20 kali lapang pandang.

Ekspresi HSP 70 pada jaringan testis hewan coba yang tidak diberikan perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan menunjukkan hasil terwarnai secara immunohistokimia, hal ini ditandai dengan sedikitnya bahkan hampir tidak ada area yang terekspresi yang ditandai dengan warna coklat pada jaringan testis (**Gambar 5.1.A**). Tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 100 mg/kg BB (**Gambar 5.1.B**), tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis

200 mg/kg BB (**Gambar 5.1.C**), dan tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 300 mg/kg BB (**Gambar 5.1.D**) terlihat adanya intensitas penyebaran sel yang terekspresi (ditandai dengan warna coklat) pada tubulus semineferus tampak lebih banyak terekspresi dibandingkan dengan **Gambar 5.1.A** sebagai kontrol.



Gambar 5.2. Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis Terhadap Ekspresi HSP 70 Perbesaran 1000x

A = Kontrol (tikus tua),

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100 mg/kgBB),

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200 mg/kgBB),

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300 mg/kgBB).

Hasil akumulasi dari ekspresi HSP 70 dianalisis menggunakan *One Way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) diantara perlakuan (**lampiran 7**). Kelompok kontrol (tikus tua yang tidak diberi perlakuan ekstrak

pegagan) rata-rata ekspresi HSP 70 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi dari HSP 70 pada jaringan testis tikus tua yang ditunjukkan dengan perbedaan secara signifikan ($p < 0,05$). (Tabel 5.1)

Tabel 5.1 Ekspresi *Heat Shock Protein 70* Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi HSP 70 \pm SD (sel)	Kenaikan terhadap Kontrol (%)
Kontrol (K)	15,20 \pm 2,38 ^a	
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	27,00 \pm 2,23 ^b	77,6
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	37,80 \pm 2,38 ^c	148
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	48,80 \pm 2,28 ^d	221

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

Menurut hasil penelitian yang didapatkan, diketahui rata-rata dari ekspresi HSP 70 tertinggi pada perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan perlakuan 3 dosis 300 mg/kgBB yakni sebesar (48,80 \pm 2,28 sel) dan ekspresi terendah dari HSP 70 pada perlakuan kontrol masih (15,20 \pm 2,38 sel). Pada kelompok perlakuan 1 100 mg/kgBB ekspresi dari HSP 70 masih (27,00 \pm 2,23 sel), sedangkan untuk kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/kgBB terjadi peningkatan ekspresi HSP 70 sebesar (37,80 \pm 2,38 sel).

Pada **Tabel 5.1** uji *One Way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan nyata pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Perlakuan pemberian ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 70 secara signifikan (**Lampiran 7**). Hasil uji Tukey menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol yang ditandai dengan perbedaan notasi (**Tabel. 5.1**). Ekspresi dari HSP 70 pada kelompok kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) berbeda signifikan pada setiap Kelompok Perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 (**Tabel 5.1**) bahwa terjadi perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi HSP 70 dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) secara signifikan ($p < 0,05$).

Kelompok tikus kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) memiliki rata-rata paling rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar ($15,20 \pm 2,38$ sel). Terjadinya penurunan secara signifikan pada tikus kontrol (tikus tua tanpa diberi perlakuan) dikarenakan tikus sudah berusia tua sehingga ekspresi dari HSP 70 rendah. Menurut Purandhar (2014) dideteksi ekspresi HSP 70 pada kondisi tua yang ditangkap testis dalam jumlah yang rendah bila dibandingkan dengan pada saat keadaan normal, dan sebagian besar terlihat pada Sel Sertoli. Penurunan HSP 70 kondisi pada testis disebabkan oleh menurunnya integritas protein untuk

melakukan folding atau pelipatan, kemudian menyebabkan protein gagal melipat. Protein yang gagal melipat akan membentuk agregat dan sudah tidak bisa digunakan lagi.

Setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam tiga dosis yang berbeda sesuai dengan literature, menunjukkan peningkatan ekspresi HSP 70 dibandingkan dengan tikus putih usia tua (kelompok kontrol) tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Perbandingan antara ekspresi HSP 70 jaringan testis tikus kelompok kontrol setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (**Tabel 5.1**). Kelompok Perlakuan 1 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 100 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 70 menjadi $(27,00 \pm 2,23 \text{ sel})$. Perbedaan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan berpengaruh dalam peningkatan ekspresi HSP 70 jaringan testis karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung zat-zat yang berfungsi sebagai profertilitas. Menurut Lusiana (2013), pegagan memiliki kandungan berupa fitosterol. Fitosterol sendiri merupakan senyawa turunan sterol, yang pada hewan ditemukan dalam bentuk kolesterol yang salah satu fungsinya adalah pembentuk hormone seks. Fitosterol bekerja dengan cara menjadi bahan baku dalam pembuatan estrogen. Estrogen sendiri akan bekerja dengan

menginduksi HSF-1 kemudian HSF-1 akan menstimulasi ekspresi dari HSP 70 (Chen, 2016).

Hal yang sama terjadi pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 200 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 70 menjadi $(37,80 \pm 2,38 \text{ sel})$. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 300 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 70 menjadi $(48,80 \pm 2,28 \text{ sel})$. Pada kelompok perlakuan 3 ini mengalami peningkatan ekspresi HSP 70 dibandingkan kelompok kontrol (tikus putih tua tanpa perlakuan) dan juga mengalami peningkatan dibandingkan dengan ekspresi HSP 70 pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 200 mg/kg BB.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki senyawa fitosterol yang dapat dijadikan bahan profertilitas alami yang berfungsi untuk meningkatkan aktivitas reproduksi jantan. Dosis yang baik digunakan adalah pada kelompok perlakuan 3 yaitu 300 mg/ kg BB, karena pada kelompok perlakuan 3 memiliki notasi yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi dari HSP 70. Menurut Tatar (1997) dalam Purandhar (2014), peningkatan induksi

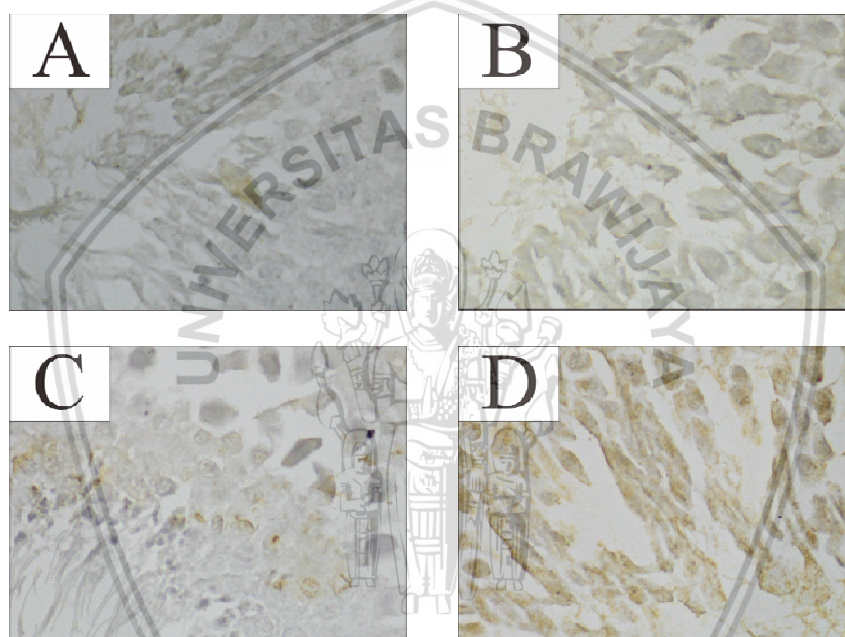
chaperone(HSP 70) dapat menyebabkan peningkatan panjang usia. Sehingga dosis yang baik untuk terapi adalah kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/kgBB.

5.2 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi HSP 90 Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan terhadap ekspresi HSP 70 (*Heat Shock Protein 90*) jaringan testis tikus putih usia tua dapat diamati menggunakan metode immunohistokimia. Hasil gambaran immunohistokimia dari ekspresi HSP 90 ditandai dengan terlihatnya warna coklat pada jaringan testis tersebut yang disebabkan oleh adanya ikatan antigen dan antibodi pada jaringan yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder sehingga dengan adanya penambahan substrat kromagen akan menimbulkan warna kecokelatan pada jaringan yang terekspresi. Pengamatan pada preparat ini dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan 20 kali lapang pandang.

Ekspresi HSP 70 pada jaringan testis hewan coba yang tidak diberikan perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan menunjukkan hasil terwarnai secara immunohistokimia, hal ini ditandai dengan sedikitnya bahkan hampir tidak ada area yang terekspresi yang ditandai dengan warna coklat pada jaringan testis (**Gambar 5.2.A**). Tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 100 mg/kg BB (**Gambar 5.2.B**), tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis

200 mg/kg BB (**Gambar 5.2.C**), dan tikus dengan pemberian ekstrak etanol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 300 mg/kg BB (**Gambar 5.2.D**) terlihat adanya intensitas penyebaran sel yang terekspresi (ditandai dengan warna coklat) pada tubulus semineferus tampak lebih banyak terekspresi dibandingkan dengan **Gambar 5.2.A** sebagai kontrol.



Gambar 5.2. Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis Terhadap Ekspresi HSP 90 Perbesaran 1000x

- A = Kontrol Positif (tikus tua),
B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100 mg/kgBB),
C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200 mg/kgBB),
D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300 mg/kgBB).

Hasil akumulasi dari ekspresi HSP 90 dianalisis menggunakan ANOVA dan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$) diantara perlakuan. Kelompok Kontrol (tikus tua yang tidak diberi ekstrak pegagan) rata-rata ekspresi HSP 90

lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi dari HSP 90 pada jaringan testis tikus tua yang ditunjukkan dengan perbedaan secara signifikan ($p < 0,05$). (**Tabel 5.2**)

Tabel 5.2 Ekspresi *Heat Shock Protein 90* Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi HSP 90 \pm SD (sel)	Kenaikan terhadap Kontrol (%)
Kontrol (K)	27,00 \pm 2,23 ^a	
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	37,20 \pm 2,58 ^b	37,7
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	46,40 \pm 3,13 ^c	71
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	55,20 \pm 2,48 ^d	104

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

Menurut hasil penelitian yang didapatkan, diketahui rata-rata dari ekspresi HSP 90 tertinggi pada perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan perlakuan 3 dosis 300 mg/kgBB yakni sebesar (55,20 \pm 2,48 sel) dan ekspresi terendah dari HSP 90 pada perlakuan kontrol masih (27,00 \pm 2,23 sel). Pada kelompok perlakuan 1 100 mg/kgBB ekspresi dari HSP 90 masih (37,20 \pm 2,58 sel), sedangkan untuk kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/kgBB terjadi peningkatan ekspresi HSP 90 sebesar (46,40 \pm 3,13 sel).

Pada **Tabel 5.2** uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan nyata pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Perlakuan pemberian ekstrak tanaman

pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 90 secara signifikan (**Lampiran 8**). Hasil uji Tukey menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol yang ditandai dengan perbedaan notasi (**Tabel. 5.2**). Pada tabel terlihat bahwa ekspresi dari HSP 90 pada kelompok kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) berbeda signifikan pada setiap Kelompok Perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 (**Tabel 5.2**) bahwa terjadi perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi HSP 90 dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) secara signifikan ($p < 0,05$).

Kelompok tikus kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan) memiliki rata-rata paling rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar $(27,00 \pm 2,23$ sel). Terjadinya penurunan secara signifikan pada tikus control (tikus tua tanpa diberi perlakuan) dikarenakan tikus suda berusia tua sehingga dapat menurunkan ekspresi dari HSP 90. Menurut Hunter (1997) dalam Purandhar (2014), pada jaringan hewan yang berumur menunjukan penurunan produksi protein stress, termasuk HSP 90. Menurut Rao (1999) dalam Purandhar (2014), hal ini terjadi karena HSP 90 dilibatkan dalam penuaan, selama proses penuaan, peningkatan konsentrasi normal HSP 90 dilemahkan dalam limfosit. Penurunan HSP 90

disebabkan oleh protein *folded* yang diterima oleh HSP 90 tidak bisa dirilis ke reseptor steroid dengan baik, karena menurunnya kemampuan HSP 90 untuk merilis protein *folded* dari chaperone lain (HSP 70).

Setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam tiga dosis yang berbeda sesuai dengan literature menunjukkan peningkatan ekspresi HSP 90 dibandingkan dengan tikus putih usia tua (kelompok control) tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Perbandingan antara ekspresi HSP 70 jaringan testis tikus kelompok control setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (**Tabel 5.2**). Kelompok Perlakuan 1 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 100 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 90 menjadi $(37,20 \pm 2,58 \text{ sel})$. Perbedaan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan berpengaruh dalam peningkatan ekspresi HSP 90 jaringan testis karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung zat-zat yang berfungsi sebagai profertilitas. Menurut Lusiana (2013), pegagan memiliki kandungan berupa fitosterol. Fitosterol sendiri merupakan senyawa turunan sterol, yang pada hewan ditemukan dalam bentuk kolesterol yang salah satu fungsinya adalah pembentuk hormone seks. Fitosterol bekerja dengan cara menjadi bahan baku dalam pembuatan estrogen. Estrogen sendiri akan bekerja dengan

menginduksi HSF-1 kemudian HSF-1 akan menstimulasi ekspresi dari HSP 70 (Chen, 2016).

Hal yang sama terjadi pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 200 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 90 menjadi $(46,40 \pm 3,13 \text{ sel})$. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 300 mg/kg BB mengalami peningkatan ekspresi HSP 90 menjadi $(55,20 \pm 2,48 \text{ sel})$. Pada kelompok perlakuan 3 ini mengalami peningkatan ekspresi HSP 90 dibandingkan kelompok kontrol (tikus putih tua tanpa perlakuan) dan mengalami peningkatan dibandingkan dengan ekspresi HSP 90 pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 200 mg/kg BB.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki senyawa fitosterol yang dapat dijadikan bahan profertilitas alami yang berfungsi untuk meningkatkan aktivitas reproduksi jantan. Dosis yang baik digunakan adalah pada kelompok perlakuan 3 yaitu 300 mg/ kg BB, karena pada kelompok perlakuan 3 memiliki notasi yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok perlakuan kontrol (Tikus tua tanpa diberi perlakuan), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan ekspresi dari HSP 90, Menurut Tatar (1997) dalam Purandhar (2014), peningkatan induksi

chaperone(HSP 90) dapat menyebabkan peningkatan panjang usia. Sehingga dosis yang baik untuk terapi adalah kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/kgBB.



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dibahas dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 70 jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tuadengan dosis pemberian terbaik yaitu 300 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi HSP 90 jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tuadengan dosis pemberian terbaik yaitu 300 mg/kg BB.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan adalah:

1. Perlunya penelitian lebih lanjut tentang penggunaan ekstrak tanaman pegagan untuk hewan ternak, hewan peliharaan dan satwa liar.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek samping dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*).

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5
- Besung, K.I. 2009. *Pegagan (Centella asiatica) sebagai alternatif pencegahan infeksi pada ternak*. Jurnal Penelitian Universitas Udayana 2(1): 1.
- Chen, Chin-Der, dkk. 2016. *High Estradiol Concentrations Induce Heat Shock Protein 70 Expression and Suppress Nuclear Factor Kappa B Activation in Human Endometrial Epithelial Cells*. College of Medicine, National Taiwan University. Biology of Reproduction 95(4):87, 1–8
- Constantinescu, G. M. 2007. Anatomy of Reproductive Organs. Didalam: Schatten, H. Constatinencu, G. M., editor. *Comparative Reproductive Biology*. Iowa: Blackwell Publishing, page : 5-23.
- Cunningham, W. 2003. *Aging and Photo-aging*. In: Baran R, Maibach HI, (eds). *Textbook of Cosmetic Dermatology*, 2nd edn. London: Martin dunitz, pp. 455-67
- Daryanto, 2011. *Sari Kuliah Manajemen Pemasaran*. Bandung: PT Sarana Tutorial Nurani Sejahtera
- Elyall, B. 2002. *Pengaruh Infus Daun Puding (Polysciasguifolei L.H. Bayle) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan (Rattus norvegicus) Galur DDy*. Jurnal Makara, sains 6 (2): 99-124
- Faranita, O. V. 2009. *Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus* [Skripsi]. Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Gohil, K. J., A. P. Jagruti, and K. Gajjar. 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica* : A Potential Herbal Cure-all. *Review Article* p546-556.
- Gupta, Y.K. and M. H. V. Kumar. 2006. *Effect of Centella asiatica L. On pentylenetetrazole-induced kindling, Cognition and Oxidative Stress in Rats*. Journal Pharmacology Biochemistry and Behavior. (3): 579-585
- Hayati, A. 2010. *Spermatologi*. Surabaya : Airlangga University Press.

- Hunter T, Poon R. Y. 1997. Cdc37: a protein kinase chaperone? Trends Cell Biol. 1997;7:157–161.
- Janquiera, L. C., C. Jose, O. K.Robert. 2007. *Histologi Dasar edisi ke-8*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kormin, S. 2005. *The effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegagan (Centella asiatica) Drink* [Thesis]. Kuala Lumpur : Universiti Teknologi Malaysia.
- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press.Yogyakarta.
- Lusiana, F. Dhafir, dan Masrianih. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur DDY. *Journal E-Jipbiol*. Vol. 2: 24-29, Desember 2013.
- Myres, P. dan Armitage, D. 2004. “*Rattus norvegicus*” Animal Diversity./http.www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus.htm [Diakses tanggal 27 Januari 2018].
- Pangkahila, W. 2007. *Memperlambat Penuaan, Meningkatkan Kualitas Hidup Anti Aging Medicine*. Cetakan ke-1. Jakarta : Penerbit Buku Kompas. Hal. 133-144.
- Prabowo. 2002. *Centella Anti Radang*. Jakarta: PT Intisari Mediatama
- Pratama, A. Y., Aullani'am., dan M. C. Padaga. 2013. *Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejenum Tikus Putih (Rattus novergicus) yang Terpapar Indometasin dan ill Suplementasi Bakteri Asam Laktat* [Skripsi]. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Purandhar, K., P. K. Jena, B. Prajapati, P. Rajput, S. Seshadri. 2014. *Understanding the Role of Heat Shock Protein Isoforms in Male Fertilty, Aging and Apoptosis*. India: Institute of Science, Nirma University, Gujarat.
- Samsiar, A. Ramadhan, dan D. Tureni. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit (Mus musculus) Galur DDY. Journal E-Jipbiol.*, Vol. 2: 20-23.

- Samson, E. Dan A. J. A, Unility.2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (Ig A) pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran.
- Sherwood, L., 2009. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Edisi VI. Jakarta : EGC
- Soejono, C. H. 2004. *Pasien Geriatri dan Permasalahannya. Artikel Medika*. no. 5 tahun XXX, Mei 2004.
- Solihati, N. 2013. *Antifertiitas Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) dan Reversibilitas Fungsi Reproduksi pada Tikus (Rattus novergicus) Jantan [Disertasi]*. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sunarjo, I. 2012. *Pemberian ekstrak Pegagan (Centella asiatica) menurunkan kadar MDA Tikus Putih yang Dipapar Asap Rokok [Thesis]*. Denpasar : Program Magister Studi Ilmu Biomedik, Universitas Udayana.
- Sutardi.2008. *Kajian Waktu Panen dan Pemupukan Fosfor Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asiatikosida Tanaman Pegagan (Centella asiatica L. Urban) di Dataran Tinggi*. Tesis. Program Studi Agronomo, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Tkavoca, J., M. Angelovicova. 2012. *Heat Shock Proteins (HSPs): a Review*. Slovakia: Slovak University of Agriculture in Nitra.
- Trott, A., J. West, L. Klaic, S. Westerheid, R. Silverman, R. Morimoto, K. Morano. 2008. *Activation of Heat Shock protein and Antioxidant Responses by the Natural Product Celastrol: Transcriptional Signatures of a Thiol –targeted Molecule*. USA: Departemen of Microbiology and Moleculer Genetics, University of Texas Medical School.
- Udiyanto, H., B. Askandar, D. Fauziah. 2013. *Ekspresi Heat Shock Protein 70 (HSP 70) dan Caspase sebagai Prediktor terhadap Operabilitas Kanker Serviks Stadium IIB setelah Mendapat Kemoterapi Neoajuvant Paclitaxel-Carboplatin*. Surakarta: Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Wardani, E. T. 2010. *Pengaruh Ekstrak Jahe (Zingiber officinale Rosc.) var. Gajah terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (Mus musculus) yang Terpapar 2-Methoxythanol [Skripsi]*. Surabaya : Universitas Airlangga Surabaya.

- Widayati, T. D. 2008. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Yogyakarta : UGM Press.
- Widjaja, F. E., L. A. Santoso, Waspadji. 2009. *Peran Heat Shock Protein Terhadap Resistensi Insulin*. Jurnal Kedokteran Indonesia, 59: 121-128
- Winarto, W. R. Dan L. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Zirkin B. R, Chen H. 2000. *Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging*. Biol Reprod. 63:977-981

